

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-015225

(43)Date of publication of application : 17.01.1997

(51)Int.Cl.

G01N 30/88

G01N 30/48

G01N 30/86

G01N 33/92

(21)Application number : 08-051700

(71)Applicant : TOSOH CORP

(22)Date of filing : 08.03.1996

(72)Inventor : KITAMURA TAKASHI

ITO SEIJI

OKAZAKI MIYO

SASAMOTO KEIKO

(30)Priority

Priority number : 07106221

Priority date : 28.04.1995

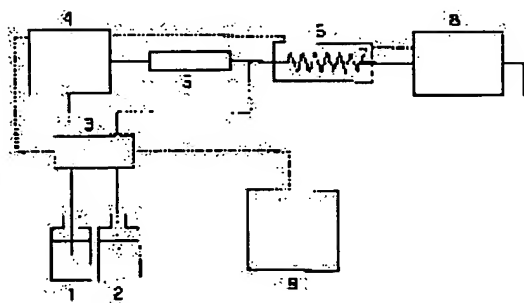
Priority country : JP

(54) METHOD FOR ANALYZING SERUM LIPOPROTEIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To determine each component easily and quickly with good reproducibility and accuracy by performing a waveform process including normal distribution curve approximation on the chromatogram of a serum lipoprotein for fractionation of the chromatogram.

SOLUTION: A sample injected from a sample injection device 4 is introduced into a separating column 5 together with an eluate 1 fed by means of a liquid feeding pump 3. The sample in the column 5 is separated into CM, VLDL, LDL, and HDL in a serum in about 15 minutes. At the exit of the column 5, the separated solutions are mixed with a reaction liquid 2 fed by means of the pump 3, and are introduced into the reaction coil 7 of a reaction oven 6 and reacted for about one to three minutes within the coil 7. The absorbance of the reaction product is measured by means of an ultraviolet and visible detector 8. The measured absorption curve of the reaction product, that is, a chromatogram, is subjected to data processing using normal distribution approximation by a system controller 9 having a built-in data processing function and, after it is fractionated into four components, the amounts of cholesterol or triglyceride in CM, VLDL, LDL, and HDL are output as measurements.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

05.12.2002

[Date of sending the examiner's decision of]

16.03.2004

rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-15225

(43) 公開日 平成9年(1997)1月17日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	30/88		G 0 1 N 30/88	J
	30/48		30/48	P
	30/86		30/86	B
	33/92		33/92	Z

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平8-51700

(22) 出願日 平成8年(1996)3月8日

(31) 優先権主張番号 特願平7-106221

(32) 優先日 平7(1995)4月28日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72) 発明者 北村 隆司

山口県熊毛郡熊毛町西勝間原1100-179

(72) 発明者 伊東 誠治

山口県新南陽市宮の前2-6-10-46

(72) 発明者 岡崎 三代

千葉県市川市市川3-28-5-603

(72) 発明者 笹本 恵子

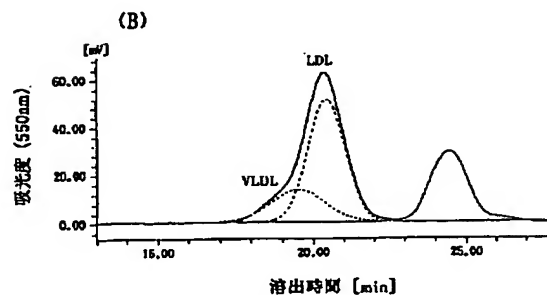
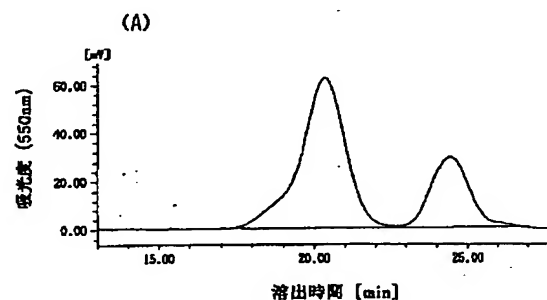
東京都杉並区永福3-26-8

(54) 【発明の名称】 血清リポタンパク質の分析方法

(57) 【要約】

【課題】測定操作の繁雑さを改良し、短時間で精密にかつ再現性良く、血清中のCM、VLDL、LDL及びHDLを一括定量でき、更に分析の自動化が容易な血清リポタンパク質の分析方法を提供する。

【解決手段】血清試料中のカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質を液体クロマトグラフィーで分離し、その結果得られたクロマトグラムをガウス分布曲線近似法を含む波形処理によりカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質に分離する処理を行うことを特徴とする、当該血清試料中のカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質の分析方法。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】血清試料中のカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質を液体クロマトグラフィーで分離し、その結果得られたクロマトグラムをガウス分布曲線近似法を含む波形処理によりカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質に分画する処理を行うことを特徴とする、当該血清試料中のカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質の分析方法。

【請求項 2】ゲルろ過用充填剤を充填してなるカラムを用いた液体クロマトグラフィーにより血清試料中のカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質を分離し、分離されたカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質のコレステロール及び／又はトリグリセリドを測定し、得られたクロマトグラムをガウス分布曲線近似法を含む波形処理に供することを特徴とする請求項 1 のリポタンパク質の分析方法。

【請求項 3】試料がヒト血清試料である請求項 1 又は 2 のリポタンパク質の分析方法。

【請求項 4】分離されたカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質のコレステロール量の測定を、コレステロールと反応して光学的に測定可能な信号を発する酵素と発色色素の組合せを用いて行うことを特徴とする請求項 2 のリポタンパク質の分析方法。

【請求項 5】分離されたカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質のトリグリセリド量の測定を、トリグリセリドと反応して光学的に測定可能な信号を発する酵素と発色色素の組合せを用いて行うことを特徴とする請求項 2 のリポタンパク質の分析方法。

【請求項 6】酵素と発色色素の組合せが、少なくともアスコルビン酸オキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ及びパーオキシダーゼからなる群から選ばれる酵素とキノン系発色色素の組合せであることを特徴とする請求項 4 のリポタンパク質の分析方法。

【請求項 7】酵素と発色色素の組合せが、少なくともアスコルビン酸オキシダーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3リン酸オキシダーゼ、リボプロテインリパーゼ及びパーオキシダーゼからなる群から選ばれる酵素とキノン系発色色素の組合せであることを特徴とする請求項 5 のリポタンパク質の分析方法。

【請求項 8】キノン系発色色素が、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン又はN-エチル-N-(3-スルホプロピル)-m-アニジジンと4-アミノアンチピリンとの酸化縮合

物であることを特徴とする請求項 6 又は 7 のリポタンパク質の分析方法。

【請求項 9】ゲルろ過用充填剤が800~1200オングストロームの平均細孔径を有する充填剤であることを特徴とする請求項 2 のリポタンパク質の分析方法。

【請求項 10】ゲルろ過用充填剤が900~1100オングストロームの平均細孔径を有する充填剤であることを特徴とする請求項 2 のリポタンパク質の分析方法。

【請求項 11】酵素及び発色色素を35~50℃の温度条件下でカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質のコレステロール及び／又はトリグリセリドと反応させることを特徴とする請求項 4 又は 5 のリポタンパク質の分析方法。

【請求項 12】酵素及び色素を45~50℃の温度条件下でカイロミクロン、超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質及び高比重リポタンパク質のコレステロール及び／又はトリグリセリドと反応させることを特徴とする請求項 4 又は 5 のリポタンパク質の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血清リポタンパク質の分析方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】血中のリポタンパク質は、コレステロール、中性脂肪（トリグリセリド）、リン脂質などの脂質とアポリポタンパク質が会合した、脂質とタンパク質の複合体であり、アポリポタンパク質の種類や脂質の含有比率などによっていくつかの種類がある。したがって、血中のリポタンパク質は単一のものではなくリポタンパク質の種類によって機能が異なるため、血清リポタンパクを分析する上で血中の総リポタンパク質を測定するだけでなく、リポタンパク質を分離し、分離した各リポタンパク質を定量することが、虚血性心疾患、肝疾患、糖尿病などの疾病と脂質代謝異常との相関の解明に重要である。

【0003】従来、リポタンパク質の分析方法としては、リポタンパク質の比重の差を利用して分離する超遠心法、リポタンパク質の表面電荷の違いを利用して分離する電気泳動法、コロイドの安定性やヘパリンとCaCl₂ 或いはデキストラン硫酸があるリポタンパク質と不溶性の沈殿物を形成することを利用した結合沈殿法、リポタンパク質分子の大きさの違いを利用して分離する液体クロマトグラフィー法などがある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】超遠心法は、分析に長時間を要し、装置が高価で操作が複雑であるなどの課題がある。電気泳動法は、日常検査に広く用いられ、定性的には優れているが、非定量的でかつカイロミクロンが分析できないなどの課題がある。結合沈殿法は、日常検査に最も広く用いられているが、高比重リポタンパク質

の測定が主流で他のリポタンパク質の測定ができず、更に沈殿条件によって測定値が異なり、操作が繁雑であるなどの課題がある。

【0005】一方、液体クロマトグラフィー法は、前処理操作が不要で、再現性が良く、数種のリポタンパク質を同時に分析できるなどの利点があるが、分離能が低く、分子サイズの大きい超低比重リポタンパク質、低比重リポタンパク質を精密に定量できないという課題がある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前述の課題点を解決するために鋭意研究を重ねた結果、高速液体クロマトグラフィーにより血清中のリポタンパク質を分離した後、分離したリポタンパク質のコレステロール及び／又はトリグリセリドと反応する酵素を含む試薬とリポタンパク質のコレステロール及び／又はトリグリセリドを反応させて得られる血清リポタンパク質のクロマトグラムにガウス分布曲線近似法を含む波形処理を行うことでカイロミクロン（以下、CM）、超低比重リポタンパク質（以下、VLDL）、低比重リポタンパク質（以下、LDL）及び高比重リポタンパク質（以下、HDL）の各成分を簡便に再現性良くかつ短時間で精密に定量できることを見出し、本発明を完成した。

【0007】即ち本発明は、血清試料中のCM、VLDL、LDL及びHDLを液体クロマトグラフィーで分離し、その結果得られたクロマトグラムをガウス分布曲線近似法を含む波形処理によりCM、VLDL、LDL及びHDLに分離する処理を行うことを特徴とする分析方法であり、特に、ゲルろ過用充填剤を充填してなるカラムを用いた液体クロマトグラフィーにより、血清試料中のCM、VLDL、LDL及びHDLを分離し、分離されたCM、VLDL、LDL及びHDLのコレステロール及び／又はトリグリセリドを測定し、得られたクロマトグラムをガウス分布曲線近似法を含む波形処理に供することを特徴とする分析方法である。以下本発明を詳細に説明する。

【0008】実施例1に示したように、超遠心法によって分離されたヒト血清のVLDL、LDL及びHDLの各標準リポタンパク質の混合比率を変えて調製した各試料を高速液体クロマトグラフィーで分離し、得られたクロマトグラムをガウス分布曲線近似法を含む波形処理を行うことで求められた各試料中のVLDL、LDL及びHDLのコレステロール量及びトリグリセリド量の割合（％）には、測定値と理論値との間に高い相関関係がある。このため、本発明によれば、血清中のLDL、VLDL及びHDLのコレステロール量及び／又はトリグリセリド量を測定することで、LDL等を定量できるのである。

【0009】本発明に用いられるガウス分布曲線近似法による波形処理は、分離が不十分なピークをガウス分布

曲線で近似することにより各ピークに分離する方法である。この場合、液体クロマトグラフィーでの分離が高いほど近似精度は高くなる。また、CMのコレステロール量及びトリグリセリド量は、総コレステロール量及び総トリグリセリド量から定量されたVLDL、LDL及びHDLのコレステロール量の和及びトリグリセリド量の和を差引くことによって定量できる。

【0010】図1（A）は、VLDL：LDL：HDLのコレステロール量比が15.6：57.0：27.4（％）の混合試料を高速液体クロマトグラフィーで分離したクロマトグラムであるが、VLDLとLDLの分離が不十分なためVLDLとLDLを精密に定量するのは困難である。これに対し、図1（B）は、図1（A）のクロマトグラムについてガウス分布曲線近似法による波形処理を行った結果（破線のクロマトグラムが波形処理後のVLDLとLDLのクロマトグラム）であるが、その面積比は15.5：57.2となり混合試料のコレステロール量比とほぼ等しく、精密な定量が可能となる。

【0011】一方、図2（A）は、VLDL：LDL：HDLのトリグリセリド量比が32.4：44.3：23.3（％）の混合試料を高速液体クロマトグラフィーで分離したクロマトグラムである。トリグリセリドの測定の場合、3成分以外にCMと遊離グリセロールのピークも認められるが、分離が不十分なため各成分の定量は困難である。これに対して図2（B）は、波形処理後のクロマトグラムである。波形処理後のVLDL：LDLの面積比は32.9：43.5となり混合試料のトリグリセリド量比とほぼ等しくなる。

【0012】血清試料は、例えば、ヒトの血液から血球成分などを除去したものが使用されるが、特別な前処理などは不要である。

【0013】血清リポタンパク質の液体クロマトグラフィーによる分離は、操作性や迅速性の向上といった観点から、高速液体クロマトグラフィーによることが好ましい。中でも、ゲルろ過用充填剤を充填してなるカラムを用いて行う高速液体クロマトグラフィーが特に好ましい。分離条件に特に制限はないが、試料中にCMが存在する場合には、少なくともVLDLから独立したピークとして分離し得るものであることが好ましく、特に好ましい例としてこれらの物質の分子サイズの差異を利用するゲルろ過用充填剤を充填してなるカラムを用いて行う高速液体クロマトグラフィーを例示できる。

【0014】特に、ゲルろ過用充填剤を充填してなるカラムを用いて行う高速液体クロマトグラフィーにより本発明を実施すれば、血清中のCM、VLDL、LDL及びHDLを良好に分離できる。CM、VLDL、LDL及びHDLを分離し得るゲルろ過用充填剤として、特に、800～1200オングストロームの平均細孔径を有するものが例示できる。平均細孔径が800オングストローム未満の充填剤ではCMやVLDLなどの分子サ

イズの大きいリポタンパク質は細孔内に入り難くなり、一方、平均細孔径が1200オングストロームを超える充填剤ではLDLやHDLなどの分子サイズの小さいリポタンパク質の分離が悪化するため、前述の通り平均細孔径が800~1200オングストロームのものが好ましい。中でも平均細孔径が900~1100オングストロームの充填剤は、血清中のCM、VLDL、LDL及びHDLを良好に分離でき、最終的ににより精度の高いリポタンパク質の分析を行うことを可能とする。

【0015】即ち、以上のような充填剤を充填したカラムを用いる高速液体クロマトグラフィーによる分離は、ガウス分布曲線近似法によるデータ処理を容易にさせ、リポタンパク質の分析精度を向上させるのである。また、操作の簡便性、分析の再現性、迅速性、さらには分析の自動化が容易であるという観点でも好ましい。なおルーチン分析として使用するには、分析時間が重視されるため高速液体クロマトグラフィーでの測定が好ましいが、この場合、充填剤としては高速液体クロマトグラフィーでの使用に充分耐える機械的強度を有するものを選択する必要がある。このような基材としては、例えば、シリカゲル、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシメタクリレート及びその他の親水性樹脂を基材とする充填剤（例えばTSK gel Lipopropak、商品名、東ソー（株）製）を一例として例示することができる。

【0016】使用する溶離液としてはリン酸緩衝液、トリス緩衝液、ピストリス緩衝液等を例示できるが、リポタンパク質を分離できるものであれば特に制限はない。緩衝液の濃度としては20~200mM、特に好ましくは50~100mMの範囲が良い。緩衝液の濃度が20mM未満では緩衝能が小さく、200mMを超えると後述の酵素試薬とCM、VLDL、LDL及びHDLのコレステロール又はトリグリセリドの反応が阻害される恐れが生じるからである。緩衝液のpHは、5~9、特に好ましくは7~8である。緩衝液のpHが5未満、あるいはpHが9を超えると、前記同様、酵素試薬との反応が阻害される恐れが生じるからである。しかし、コレステロール及び／又はトリグリセリドの測定を、酵素を用いないで行う場合等はこの限りではない。

【0017】以上のようにして分離されたCM、VLDL、LDL及びHDLのコレステロール及び／又はトリグリセリドを、コレステロール及び／又はトリグリセリドと反応して光学的に測定可能な信号を発する酵素と発色色素からなる試薬と反応させる。ここでいう光学的に測定可能な信号とは、例えば蛍光検出器や紫外可視検出器などで測定し得る信号を意味する。

【0018】本発明で使用するコレステロールと反応する試薬としては、酵素では例えばアスコルビン酸オキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ及びパーオキシダーゼを、これら酵素と組

合わせる発色色素では例えばキノン系発色色素を上げることができる。キノン系発色色素としては、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン又はN-エチル-N-(3-スルホプロピル)-m-アニシジンと4-アンチアミノピリンの酸化縮合体が挙げられる。より具体的には、市販のデタミナーLTG（商品名、協和メデックス（株）製）や、コレスカラー・リキッド（商品名、東洋紡（株）製）等が例示できる。

【0019】また、トリグリセリドと反応する試薬としては、酵素では、例えばアスコルビン酸オキシダーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール-3リン酸オキシダーゼ、リボプロテインリパーゼ及びパーオキシダーゼを、これら酵素と組合せる発色色素では、例えばキノン系発色色素を上げることができる。キノン系発色色素としては、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン又はN-エチル-N-(3-スルホプロピル)-m-アニシジンと4-アンチアミノピリンの酸化縮合体が挙げられる。より具体的には、市販のデタミナーLTG（商品名、協和メデックス（株）製）や、リビドス・リキッド（商品名、東洋紡（株）製）等が例示できる。

【0020】これらの試薬とCM、VLDL、LDL及びHDLのコレステロール及び／又はトリグリセリドとの反応温度は、35~50℃、好ましくは45~50℃が良い。反応温度が35℃未満では反応が不十分になりやすく、また、50℃を超えると反応中に酵素が劣化する恐れが生じるからである。コレステロール及び／又はトリグリセリド量の決定は、例えば紫外可視検出器を用いて吸光度を測定する場合、コレステロール濃度及び／又はトリグリセリド濃度が既知の標準血清について同様の操作（測定）を実施した時の結果に基づき作成された検量線と、実際に測定された吸光度を比較すること実施できる。なお、前記のキノン系発色色素の試薬を用いた場合の紫外可視検出器の測定波長は、540~560nmとすれば良い。

【0021】本発明を実施するための装置について、図10で示した分析装置の一例に基づき具体的に説明する。

【0022】試料は、一度に多数の検体がセットできる試料注入装置4にセットされる。4から注入された試料は、高速液体クロマトグラフィー用送液ポンプ3によって送液される溶離液1と共に分離カラム5に導入される。分離カラム5に導入された試料は、血清中のCM、VLDL、LDL及びHDLに約15分以内で分離される。分離されたCM、VLDL、LDL及びHDLは送液ポンプ3で送液されるコレステロール又はトリグリセリド反応試薬2と分離カラム5の出口で混合され、反応オープン7の中の反応コイル7に導入されコイル内で約1~3分間反応される。反応生成物の吸光度は紫外可視

検出器8で測定される。測定された反応生成物の吸収曲線、即ち、クロマトグラムはさらにデータ処理機能を内蔵したシステム制御装置9でガウス分布曲線近似法によりデータ処理され、CM、VLDL、LDL及びHDLの4成分に分画された後、CM、VLDL、LDL及びHDLのコレステロール量又はトリグリセリド量が測定結果として出力される。また、多量の試料を自動分析する場合は、送液ポンプ3の流速、試料注入装置4の試料注入量及び試料注入順序、反応オープン6の反応温度、紫外可視検出器8の検出波長及び吸光度の測定、さらにデータ処理及び測定結果の出力等の各機器の制御にシステム制御装置9が使用される。

【0023】

【発明の効果】従来、リポタンパク質の分析には、超遠心法、電気泳動法、結合沈殿法などが用いられていたが、CM、VLDL、LDL及びHDLの簡便、短時間の再現性良い分析やこれら4成分の同時分析は困難であった。一方、液体クロマトグラフィー法は、他の従来法に比べて短時間で簡便に、かつ同時分析ができるなどの多くの利点があったが、CM、VLDL、LDL及びHDLを完全に分画することが困難で、精密な分析は困難であった。

【0024】これに対して本発明では、液体クロマトグラフィー法の分離能の低さをガウス分布曲線近似法によるデータ処理を行うことによって解決し、血清リポタンパク質の分析をカラムによる分離とデータ処理とを組み合わせることによって、血清中のCM、VLDL、LDL及びHDLの量を反映するコレステロール量及び／又はトリグリセリド量を精密に定量することが可能となる。従って本発明によれば、試料の前処理を必要とせず、特に好ましく血清を高速液体クロマトグラフィーで分析した場合、1検体の分析時間がコレステロール分析の場合約15分、トリグリセリド分析の場合約26分で、CM、VLDL、LDL及びHDLを同時分析できるという、従来の分析法に比べて操作性、迅速性及び定量性の面において優れた分析法が提供される。

【0025】また、本発明は、分析システムの各構成機器の設定条件を制御できるシステムコントローラを使用することにより、自動化も容易である。

【0026】

【発明の実施の形態】以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明は実施例に必ずしも限定されるものではない。

【0027】実施例 1

図10に示した装置により、血清リポタンパク質の分析を実施した。分離カラムとしては市販のカラム(TSK gel Lipopropak 商品名、東ソー(株)製、内径7.5mm、長さ30cm)を、試料注入装置4には市販の装置(AS-8020 商品名、東ソー(株)製)を、紫外可視検出器8には市販の装置(UV-8020 商品名、東ソー(株)製)を用い、検出波長は550nmに設定した。

【0028】反応オープン6には市販の装置(CO-8020 商品名、東ソー(株)製)を、反応コイルには市販の装置(反応コイルK、商品名、東ソー(株)製、内径0.4mm、長さ7.5m)を用い、反応温度は45℃とした。

【0029】また、送液ポンプ3には市販の装置(CCPM 商品名、東ソー(株)製)を用い、送液ポンプの流速は溶離液に対して0.7ml/min、コレステロール反応試薬又はトリグリセリド反応試薬に対して0.35ml/minに設定した。

【0030】溶離液1には、75mM トリス緩衝液(pH7.5)を用いた。反応試薬2には、コレステロール分析の場合、市販の試薬(デタミナーLTC、商品名、協和メデックス(株)製)を用いた。また、トリグリセリド分析の場合、市販の試薬(デタミナーLTG、商品名、協和メデックス(株)製)を用いた。試料としては、超遠心法によって分離されたヒト血清のVLDL、LDL及びHDLの標準リポタンパク質を混合比率(タンパク質量比)を変えて調製した試料を、コレステロール分析の場合各10μl、トリグリセリド分析の場合各20μl使用した。

【0031】コレステロールの分析結果を表1、図3、図4及び図5に、トリグリセリドの分析結果を表2、図6、図7及び図8に示す。

【0032】

【表1】

各リポタンパク質標品の混合比	混合試料中の各リポタンパク質成分のコレステロール量比 (理論値)		
VLDL:LDL:HDL	VLDL(%)	LDL(%)	HDL(%)
1:3:6	15.6	57.0	27.4
3:6:1	28.6	68.9	2.5
3:1:6	50.2	20.4	29.4
3:4:3	34.3	55.6	10.1
8:1:1	84.1	12.8	3.1
各リポタンパク質標品の混合比	混合試料中の各リポタンパク質成分のコレステロール量比 (測定値)		
VLDL:LDL:HDL	VLDL(%)	LDL(%)	HDL(%)
1:3:6	15.5	57.2	27.3
3:6:1	29.2	68.1	2.7
3:1:6	50.3	20.5	29.2
3:4:3	35.8	54.3	9.9
8:1:1	84.7	12.0	3.3

【0033】表1は、前記の混合試料中のVLDL、LDL及びHDLのコレステロール量比(%)について、各標品を単独で測定して得られるコレステロール量から求めた理論値と、同一試料を前記分析条件で分離し、ガウス分布曲線近似法によるデータ処理によって得られたコレステロール量の比(%)の測定値を比較したものである。

【0034】図3、4、及び5は表1の結果に基づいて作成した各混合試料中のVLDL、LDL及びHDLのコレステロールの量の理論値と測定値の相関関係を示す

ものである。図から明らかなように、VLDL、LDL及びHDLとも理論値と測定値には高い相関関係がある。また、試料中の総コレステロール、VLDL、LDL及びHDLのコレステロール量を測定し、総コレステロールからVLDL、LDL及びHDLのコレステロール量の和を差引くことによりCMのコレステロール量も算出できる。

【0035】

【表2】

各リポタンパク質標品の混合比	混合試料中の各リポタンパク質成分のトリグリセリド量比 (理論値)		
VLDL:LDL:HDL	VLDL(%)	LDL(%)	HDL(%)
1:5:5	65.7	22.5	11.8
1:20:20	32.4	44.3	23.3
1:100:100	8.7	59.8	31.5
1:20:100	16.7	22.9	60.4
1:100:20	11.7	79.9	8.4
各リポタンパク質標品の混合比	混合試料中の各リポタンパク質成分のトリグリセリド量比 (測定値)		
VLDL:LDL:HDL	VLDL(%)	LDL(%)	HDL(%)
1:5:5	68.1	19.4	12.5
1:20:20	32.9	43.5	23.6
1:100:100	7.5	59.6	32.9
1:20:100	16.4	25.1	58.5
1:100:20	13.5	77.3	9.2

【0036】表2は、同様に、各混合試料中のVLDL、LDL及びHDLのトリグリセリド量比(%)について、理論値と測定値を比較したものである。図6、7、及び8は表2の結果に基づいて作成した各試料中のVLDL、LDL及びHDLのトリグリセリドの量の理論値と測定値の相関関係を示すものである。図から明らかなように、VLDL、LDL及びHDLとも理論値と測定値には高い相関関係があり、同様に、トリグリセリドの各分画の定量を行うことが可能である。

【0037】実施例 2

実施例1と同様に、総コレステロール量が152mg/dlの血清試料を分析した。図9は、従来のデータ処理方法でCM、VLDL、LDL及びHDLに分離されたクロマトグラムを示すものである。

【0038】本発明によって測定した総コレステロール、CM、VLDL、LDL及びHDLのコレステロー

ル量は、それぞれ151.0mg/dl、1.2mg/dl、44.1mg/dl、65.3mg/dl及び40.4mg/dlであった。これに対し、同一試料について、ガウス分布曲線近似法による波形処理を行わずに従来の液体クロマトグラフィー法のデータ処理方法に用いられているピーク分割法で測定した総コレステロール、CM、VLDL、LDL及びHDLのコレステロール量は、それぞれ151.2mg/dl、1.3mg/dl、29.0mg/dl、80.6mg/dl及び40.3mg/dlであった。

【0039】同一試料中のトリグリセリドを市販のトリグリセリド測定用の試薬キット(デタミナーLTG、商品名、協和メデックス(株)製)を用いてマニュアルに従って測定したところ、試料中のトリグリセリド量は224mg/dlであった。現在、LDLのコレステロール量は、(LDLコレステロール) = (総コレステロー

ル) - (HDLコレステロール) - (0.2 × トリグリセリド) という経験式 (Friedewald の式) より算出されていることから、LDL のコレステロール量をトリグリセリドの測定結果と経験式より求めると 66.1 mg/dl となり、本発明法の測定結果とは良く一致するが、従来のデータ処理方法で得られた LDL のコレステロール量とは約 20% の測定誤差が認められた。

【0040】実施例 3

実施例 1 と同様に、2 種類の血清試料 (試料 A、B) 中のコレステロールを分析した。その結果、試料 A の総コレステロール、CM、VLDL、LDL 及び HDL のコレステロール量は、153.0、1.1、73.3、40.8、及び 37.3 mg/dl であった。また、試料 B の総コレステロール、CM、VLDL、LDL 及び HDL のコレステロール量は、280.2、1.9、75.4、125.5 及び 77.4 mg/dl であった。

【0041】実施例 4

実施例 1 と同様に、2 種類の血清試料 (試料 C、D) 中のトリグリセリドを分析した。その結果、試料 C の総トリグリセリド、CM、VLDL、LDL 及び HDL のトリグリセリド量は、309.9、0.8、214.7、57.1 及び 37.3 mg/dl であった。また、試料 D は、総トリグリセリド、CM、VLDL、LDL 及び HDL のトリグリセリド量は、148.3、7.9、77.4、52.2 及び 10.7 mg/dl であった。

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、VLDL、LDL、及び HDL のコレステロール量比が 15.6 : 57.0 : 27.4 (%) の混合試料を高速液体クロマトグラフィーで分離して得られたクロマトグラム (A) とガウス分布曲線近似法による波形処理をして得られたクロマトグラム (B) を示す。

【図 2】図 2 は、VLDL、LDL、及び HDL のトリグリセリド量比が 32.4 : 44.3 : 23.3 (%) の混合試料を高速液体クロマトグラフィーで分離して得られたクロマトグラム (A) とガウス曲線近似法による波形処理をして得られたクロマトグラム (B) を示す。

【図 3】図 3 は、縦軸に各試料中の VLDL のコレステロール量の割合 (%) の測定値、横軸に同一試料中の VLDL のコレステロール量の割合 (%) の理論値をプロットした相関図である。

【図 4】図 4 は、縦軸に各試料中の LDL のコレステロール量の割合 (%) の測定値、横軸に同一試料中の LDL のコレステロール量の割合 (%) の理論値をプロットした相関図である。

【図 5】図 5 は、縦軸に各試料中の HDL のコレステロール量の割合 (%) の測定値、横軸に同一試料中の HDL のコレステロール量の割合 (%) の理論値をプロットした相関図である。

【図 6】図 6 は、縦軸に各試料中の VLDL のトリグリセリド量の割合 (%) の測定値、横軸に同一試料中の VLDL のトリグリセリド量の割合 (%) の理論値をプロットした相関図である。

【図 7】図 7 は、縦軸に各試料中の LDL のトリグリセリド量の割合 (%) の測定値、横軸に同一試料中の LDL のトリグリセリド量の割合 (%) の理論値をプロットした相関図である。

【図 8】図 8 は、縦軸に各試料中の HDL のトリグリセリド量の割合 (%) の測定値、横軸に同一試料中の HDL のトリグリセリド量の割合 (%) の理論値をプロットした相関図である。

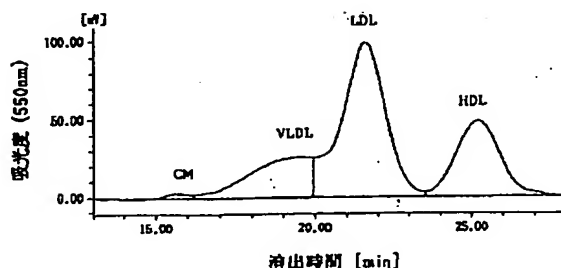
【図 9】図 9 は、実施例 2 で得られたクロマトグラムを示す。

【図 10】図 10 は、本発明法を用いた装置の一例を示す概略図である。

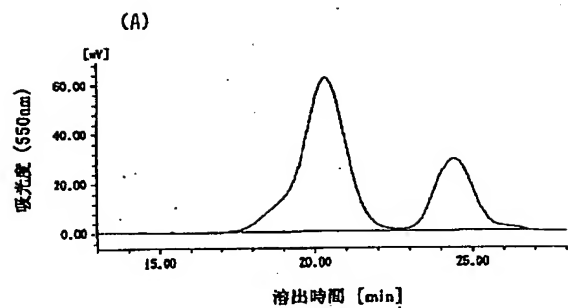
【符号の説明】

- 1 溶離液
- 2 反応液
- 3 送液ポンプ
- 4 試料注入装置
- 5 分離カラム
- 6 反応オープン
- 7 反応コイル
- 8 紫外可視検出器
- 9 システムコントローラ

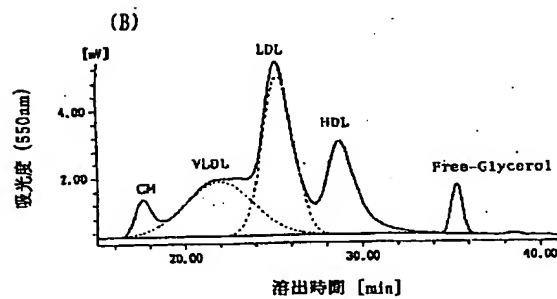
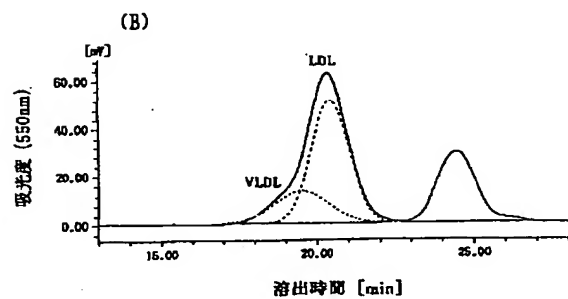
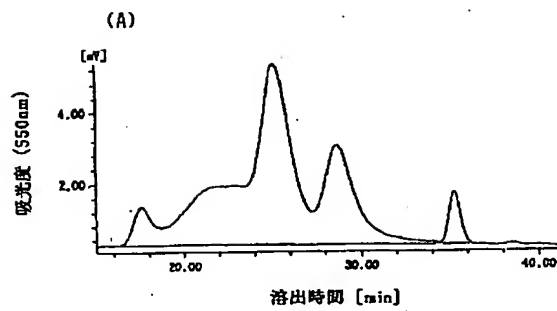
【図 9】



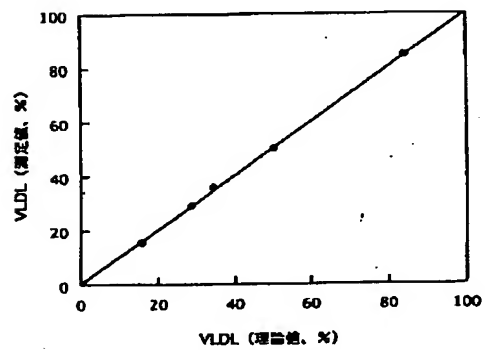
【図1】



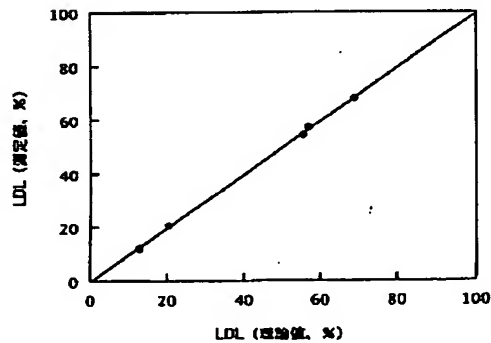
【図2】



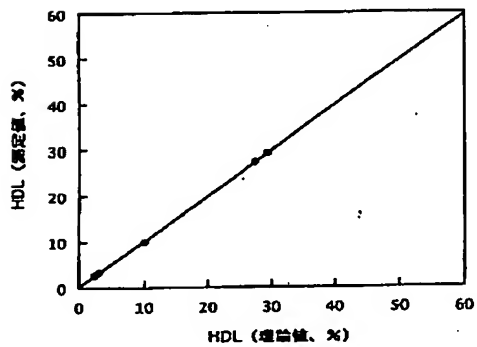
【図3】



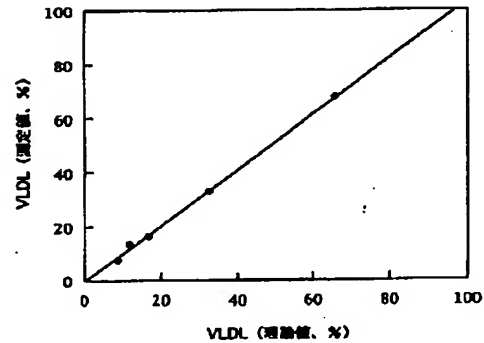
【図4】



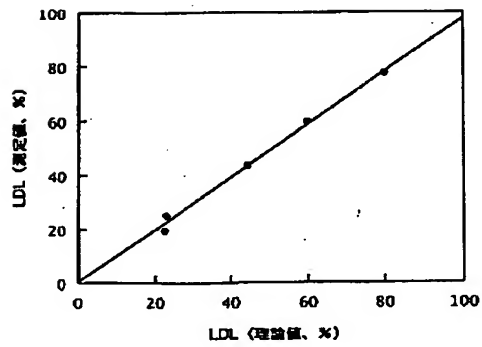
【図5】



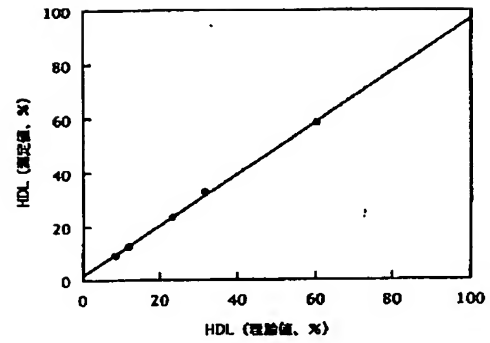
【図6】



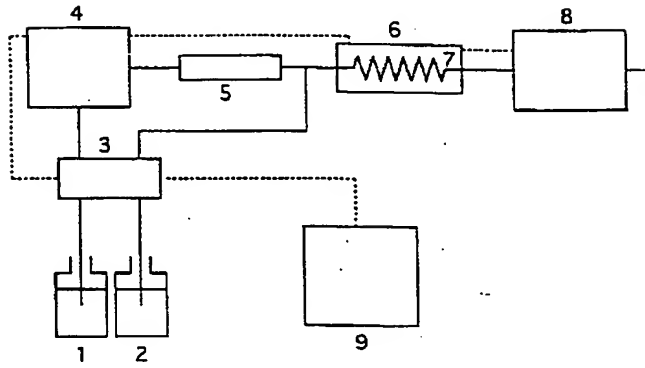
【図 7】



【図 8】



【図 10】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.